



TITLE:

Effect of sphingomyelin on the lipid-export activities of ABCA1 and ABCB4(Abstract_要旨)

AUTHOR(S):

Yu, Zhao

CITATION:

Yu, Zhao. Effect of sphingomyelin on the lipid-export activities of ABCA1 and ABCB4. 京都大学, 2015, 博士(農学)

ISSUE DATE:

2015-07-23

URL:

<https://doi.org/10.14989/doctor.k19241>

RIGHT:

(続紙 1)

京都大学	博士（農学）	氏名	趙禹
論文題目	Effect of sphingomyelin on the lipid-export activities of ABCA1 and ABCB4 (ABCA1とABCB4の脂質排出活性に対するスフィンゴミエリンの影響)		
(論文内容の要旨)			
<p>脂質は生体膜の重要な構成成分であり生体に必須な物質であるが、脂質の過剰な蓄積は動脈硬化症を引き起こし、さらに糖尿病などの生活習慣病の原因となる。ABC蛋白質はATP依存的にさまざまな物質を輸送するトランスポーターファミリーであり、そのいくつかのメンバーは生体膜中の脂質を輸送し、脂質恒常性維持に重要な役割を果たしている。たとえばABCA1は、全身の細胞で余剰なコレステロールをホスファチジルコリン(PC)とともに細胞外に排出し、血中のアポリポ蛋白質A-I(apoA-I)との複合体である新生HDLを形成する。そして、それによってコレステロール恒常性の鍵を握っている。またABCB4は、肝細胞の毛細胆管壁に特異的に発現し、毛細胆管中にPCを分泌して胆汁酸ミセルを形成することによって、胆汁中の胆汁酸の界面活性作用を緩和し、毛細胆管壁並びに肝臓を健全な状態に保っている。</p> <p>本研究では、脂質輸送に関与する二つのABC蛋白質であるABCA1とABCB4に関して、特に細胞膜環境がこれらのABC蛋白質の機能に与える影響に着目し比較を行った。その結果、これら二つのABC蛋白質は、どちらもPCとコレステロールを基質として輸送するにもかかわらず、それぞれの脂質排出活性に対する細胞膜中のスフィンゴミエリン(SM)量の変化の影響が、互いに大きく異なることが明らかとなった。</p> <p>第一章では、細胞膜中のSM量の減少がABCA1の脂質排出活性に与える影響を検討した。本研究では、ABCA1を安定的に発現したHEK293細胞（HEK/ABCA1）およびGeneSwitchシステムでABCA1を誘導発現できるBHK細胞（BHK/ABCA1）の二種類の細胞系を用いた。さらに、作用機構の異なる二種類のSM合成阻害剤ミリオシンとHPA-12を用いてSM量を減少させた。まず、これらSM合成阻害剤によって細胞のSM含量が20-25%減少する条件を確立した。それらの条件では、どちらの阻害剤も細胞の生存や増殖に影響を与えなかった。ミリオシンを用いてSM量を低下させると、apoA-Iに依存したPCとコレステロールの排出量は、HEK/ABCA1細胞ではそれぞれ18%と37%上昇し、BHK/ABCA1細胞ではそれぞれ18%と16%上昇した。次に、apoA-Iの代わりに胆汁酸の一種であるタウロコール酸ナトリウム存在下で脂質排出を検討した結果、ミリオシンとHPA-12のいずれの阻害剤を用いてもSM量を減少させても、HEK/ABCA1とBHK/ABCA1細胞からの脂質排出が上昇することが明らかになった。以上のように、二種類の細胞系において作用点の異なるSM合成阻害剤が、ABCA1依存的な脂質排出を促進することが明らかになった。また、apoA-Iに依存した脂質排出のみならず、胆汁酸存在下における脂質排出が促進されたことから、ABCA1の脂質輸送活性自身が、細胞膜中のSM量の減少によって促進されることが明らかになった。</p>			

第二章では、細胞膜中のSM量の減少が、ABCB4の脂質排出活性に与える影響を検討した。ABCA1と同様に、ABCB4をHEK293細胞とBHK細胞に発現させ（それぞれHEK/ABCB4とBHK/ABCB4）、ミリオシンとHPA-12を用いて細胞のSM量を減少させ、脂質排出活性を検討した。ABCA1の場合とは反対に、ミリオシンを用いてHEK/ABCB4細胞のSM量を減少させると、PC排出が31%減少した。BHK/ABCB4細胞においても、ミリオシン処理によってPC排出が28%、コレステロール排出が34%減少した。また、ミリオシンの代わりにHPA-12で細胞を処理しても、BHK/ABCB4からのPCとコレステロール排出は、それぞれ27%と29%減少した。これらの結果から、SM量の減少がABCA1とABCB4に与える影響は正反対であり、ABCA1による脂質排出を促進するのに対し、ABCB4による脂質排出を抑制することが明らかになった。以上の結果は、これら二つのABC蛋白質が異なった膜環境で機能することを示唆した。そこで、数種類の界面活性剤を用いて細胞膜を可溶化し、ABCA1とABCB4の細胞膜上の局在を比較した。Triton X-100 (1%)を用いてBHK細胞膜を溶解すると、ABCA1とABCB4はともに可溶性画分に回収された。一方、CHAPS (1%)を用いて溶解すると、ABCA1は可溶性画分に回収されるのに対し、ABCB4は不溶性画分に回収されることが明らかになった。Triton X-100不溶性画分とCHAPS不溶性画分の脂質組成をLC-ESI/MS/MSを用いて調べ、含有膜脂質の脂肪酸鎖長や不飽和度の相違を検討した。しかし、Triton X-100不溶性画分とCHAPS不溶性画分はいずれもSMに富み、膜脂質の脂肪酸鎖長や飽和度に明確な差異がないことが明らかになった。

以上のように、ABCA1とABCB4はどちらもPCとコレステロールを基質として輸送するにもかかわらず、互いに異なる細胞膜微小環境に局在すること、ABCA1がSMの比較的少ない膜環境で機能するのに対し、ABCB4はSMが豊富な膜環境で機能し、脂質輸送活性がSMに依存することが明らかになった。ABCB4が機能する毛細胆管壁はSMを豊富に含み、胆汁酸に対して耐性となっていることが知られている。ABCB4は、SMが豊富な膜環境でPCを輸送するように機能が最適化されたと考えられる。

注) 論文内容の要旨と論文審査の結果の要旨は1頁を38字×36行で作成し、合わせて、3,000字を標準とすること。

論文内容の要旨を英語で記入する場合は、400～1,100 wordsで作成し
審査結果の要旨は日本語500～2,000字程度で作成すること。

(続紙 2)

(論文審査の結果の要旨)

ABC蛋白質は体内のコレステロール恒常性を維持するために重要な役割を担う。ABC蛋白質は生体膜で機能し、膜脂質を輸送することによってこの役割を果たす。膜脂質はこれらのABC蛋白質の輸送基質であると同時に、生体膜の構成成分としてABC蛋白質が機能する膜環境に影響を与える。細胞膜の成分であるSM量の変化はいくつかのABC蛋白質の活性に影響することが知られているが、それが輸送基質の濃度変化によるのか、細胞膜環境の変化に起因するのか不明であった。本論文は、同じ膜脂質を輸送するABCA1とABCB4の輸送活性を比較することによって、ABC蛋白質の活性が細胞膜環境に依存することを明確に示したものであり、評価すべき点は以下の通りである。

1. ABCA1とABCB4はいずれもPCとコレステロールを基質として輸送するにもかかわらず、細胞膜のSM量の変化の輸送活性に与える影響が正反対であることを示した。
2. ABCA1依存的な脂質排出活性がSM量の減少によって促進されるのに対して、ABCB4依存的な脂質排出活性がSM量の減少によって抑制されることを明らかにした。
3. ABCA1とABCB4の機能する細胞膜微小環境が互いに異なり、ABCB4がPCを生理的基質として輸送するにもかかわらず、SMの豊富な膜環境で機能することを明らかにした。

以上のように、本論文はABC蛋白質の輸送活性が細胞膜環境に依存することを明確に示し、膜環境の改変によって脂質恒常性を改善することが可能であることを初めて示したものであり、生化学、分子生物学、細胞生物学、基礎生理学に寄与するところが大きい。

よって、本論文は博士（農学）の学位論文として価値あるものと認める。

なお、平成27年5月7日、論文並びにそれに関連した分野にわたり試問した結果、博士（農学）の学位を授与される学力が十分あるものと認めた。

注) 論文内容の要旨、審査の結果の要旨及び学位論文は、本学学術情報リポジトリに掲載し、公表とする。

ただし、特許申請、雑誌掲載等の関係により、要旨を学位授与後即日公表することに支障がある場合は、以下に公表可能とする日付を記入すること。

要旨公開可能日： 年 月 日以降（学位授与日から3ヶ月以内）